

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500838

研究課題名(和文)加齢指標タンパク質30の発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms for senescence marker protein 30 expression

研究代表者

新井 秀明(Arai, Hideaki)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：60313160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢指標タンパク質30(SMP30)は加齢にともないラット肝臓で顕著に発現が減少するタンパク質として同定された。ヒトSMP30の遺伝子発現調節機構を明らかにすることは老化のメカニズムを知り老化を予防する方策を開発する上で重要である。老化という現象は進化的に高度に保存されたシグナル伝達系により調節を受け最も主流となるシグナル伝達系はインスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系(IIS)である。本研究ではヒト細胞HepG2を用いて、SMP30がIIS伝達系により制御を受けることが明らかとなった。ヒトSMP30遺伝子の配列の解析から、この制御にはFOXO転写因子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Senescence marker protein 30 (SMP30) was identified as a marker protein which shows substantial decrease in ageing rat liver. The molecular mechanisms regulating SMP30 expression is unclear. Elucidation of this regulatory mechanisms is crucial for development of countermeasures against age-related decline of physical fitness and age-associated diseases. Ageing is a highly regulated process with evolutionally conserved signal transduction mechanisms, among which insulin-insulin like growth factor signaling (IIS) is predominantly important. In this study, I found that SMP30 expression in human HepG2 cells was regulated by IIS. Detailed analysis of human SMP30 gene indicated that SMP30 is regulated by Forkhead box transcription factor class O (FoxO), an ortholog of worm longevity gene daf-16. However, direct demonstration of FoxO involvement was hardly feasible because of the extremely low level of SMP30 expression in HepG2, probably reflecting lack of cofactor(s) for FoxO regulation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：老化 加齢 アンチエイジング 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

先進諸国は急速な高齢化を迎えており、加齢にともなう身体機能の低下を予防することは極めて重要な課題である。このような加齢にともなう身体機能の低下(老化)をより合理的に予防するためには、老化に関する分子メカニズムを解明することが本質的に重要であるといえる。老化の分子メカニズムが明らかとなれば、対処療法でない根本的な老化の予防法の確立が期待できる。

このような観点から東京都健康長寿医療センターの丸山直記博士らの研究グループは、ラットの加齢にともなって発現量の変化する肝臓のタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に解析した。この解析によりいくつかのタンパク質の発現量が加齢により減少することを見だし、特に顕著な減少を示したタンパク質を加齢指標タンパク質 30 (Senescence Marker Protein 30; SMP30)と名付けた。以上のことから、SMP30 は老化過程における細胞内の何らかのシグナル伝達の変化に対応したマーカータンパク質であると予想された。しかしながら、SMP30 遺伝子の発現制御機構に関しては不明な点が多い。また、ヒト SMP30 とマウス SMP30 では相同性が高いもののマウス SMP30 はアスコルビン酸の生合成に関与することが明らかとなっている。ヒトではアスコルビン酸の生合成は行われないため、ヒト SMP30 の機能は不明である。また、同じ理由によりヒト SMP30 とマウス SMP30 の発現制御機構は大きく異なることが予想されるが、このヒトでの発現制御機構はヒト由来の細胞を用いない限り解析が不可能である。SMP30 ノックアウトマウスの解析ではアスコルビン酸生合成不全という問題が常に存在するため、老化に特異的な SMP30 の機能を解析することは困難であるといえる。

一方で、生体の老化という現象は一般的には無秩序でランダムな過程であり特定の制御系を持たない現象としてとらえられている。しかしながら最近の研究から、老化という現象は進化的に高度に保存されたシグナル伝達系による制御を受けることが分かってきた。これらの老化制御のシグナル伝達系のうち、最も主要なシグナルはインスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系である。インスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系が何らかのかたちで阻害されるか機能不全を起こすとその個体は老化が抑制され寿命が延びることが知られている。これは線虫・ショウジョウバエ・マウスを用いた実験から明らかにされてきた。現在では、インスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系は最も主要な老化制御シグナル伝達機構であることがほぼ確立された知見であるといえる。

## 2. 研究の目的

上述のように、マウス SMP30 とヒト SMP30 では明確に機能が異なるため、その遺伝子発現調節機構も大きく異なることが予想された。マウス SMP30 の遺伝子発現機構はアスコルビン酸の生合成機構の制御を解析する研究になってしまう可能性が非常に高い。本研究の本来の目的は、老化制御の分子機構と老化による身体機能の低下を予防する方策の探索である。このため、本研究では、ヒト SMP30 の発現制御機構と老化制御のシグナル伝達機構との関連を明らかにすることを目的とした。特に、老化制御シグナルの最も主要なシグナル伝達系である、インスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系との関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた SMP30 発現に影響を及ぼす因子の探索

ヒト hepatoma 由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、老化制御の中心的なシグナル伝達系であるインスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系に関連するタンパク質の活性化剤・阻害剤により細胞を刺激し、HepG2 細胞でのヒト SMP30 の発現量の検討を行った。

(2) 遺伝子データベースを用いた転写因子認識配列の検索

ヒトおよびマウスの遺伝子配列のデータベースの検索を行い、ヒトおよびマウスの SMP30 遺伝子上の老化制御シグナルに関連する転写因子の認識配列 (cis-element) を検索した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に対するインスリン刺激の影響の検討

HepG2 細胞をリコンビナントヒトインスリンで刺激し、24 時間後に細胞を回収した。細胞からタンパク質を抽出しウエスタンブロット法により HepG2 の内在性の SMP30 のタンパク質量の変化を検討した。インスリン刺激 24 時間で、コントロール群と比較して SMP30 タンパク質量の顕著な減少が観察された。また、このインスリン刺激によるヒト SMP30 のタンパク質量の減少は、Phosphoinositide 3 kinase (PI3K)の阻害剤である LY294002 の存在下では観察されなかった。以上のことから、ヒト SMP30 はインスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系により強く抑制を受けること、また、この影響はインスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系の最も主要なシグナルカスケードである PI3K シグナ

ルを介していることが明らかとなった。

## (2) ヒト SMP30 遺伝子上の老化関連転写因子認識配列の検索

インスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系において、PI3K の下流で働く因子は多数存在する。このうち、PI3K の下流シグナル系における最も重要なキナーゼに Akt がある。Akt はさまざまな基質をリン酸化することで、インスリン・インスリン様成長因子シグナル伝達系において中心的な役割を果たしている。

老化・寿命との関連では、PI3K は線虫における age1 遺伝子のオルソログである。Age1 遺伝子は単一の遺伝子変異により線虫の寿命を延長することが証明された最初の遺伝子である。線虫を用いた分子遺伝学的な実験により、age1 遺伝子は daf-2 遺伝子の下流で働くことが明らかとされている。Daf-2 遺伝子の変異体は寿命が延長されることが分かっており、daf-2 遺伝子の哺乳類オルソログはインスリン・インスリン様成長因子受容体である。線虫においては daf-2 変異による寿命延長効果は daf-16 に依存することが分かっている。哺乳類における daf-16 オルソログは Forkhead box transcription factor class 0 (Fox0) である。Fox0 転写因子は特定の DNA 配列を認識しその遺伝子の発現を調節している。Fox0 転写因子は Akt の直接の基質であることが分かっている。Fox0 転写因子は Akt によりリン酸化を受け核外移行し不活性化される。以上のように、線虫および哺乳類において、daf-2・インスリン・インスリン様成長因子受容体よりも下流のシグナル伝達系が遺伝子変異などにより阻害・機能低下を起こし、結果として daf-16・Fox0 が活性化することが個体の寿命を延長するという老化制御のシグナル伝達系は進化的に高度に保存されている。

前述の実験結果から、HepG2 細胞においてはインスリン・インスリン様成長因子シグナルの活性化により SMP30 のタンパク質発現量が顕著に減少したため、この抑制効果は Fox0 転写因子が不活性化したためではないかと考えられた。Fox0 転写因子は PI3K の下流で不活性化を受けるが、PI3K の阻害剤の存在下ではインスリンによる発現抑制効果がキャンセルされることから有力な仮説であると考えられた。

そこで、データベースからヒト SMP30 遺伝子の配列を検索したところ、coding sequence の周辺に Fox0 転写因子の認識配列が複数箇所存在していた。この認識配列はマウス SMP30 遺伝子においても存在していたものの、ヒトとマウスにおいて DNA 配列は非常に異なっておりヒト SMP30 に独自の制御機構があることが強く示唆された。

ヒト SMP30 遺伝子上の Fox0 転写因子認識

配列が実際に機能的に意味があるか否かを確認するため、クロマチン免疫沈降の実験を計画した。しかしながら、HepG2 細胞におけるヒト SMP30 タンパク質の発現量は、マウス肝臓におけるタンパク質発現量と比較して極めて微量であった。同様にマウス肝臓由来細胞株 Hepa1-6 細胞においても、マウス SMP30 タンパク質の発現量は著しく微量であった。このことから、クロマチン免疫沈降は実験自体が極めて困難であることが予想された。以上のことから、HepG2 細胞においては、ヒト SMP30 遺伝子は Fox0 転写因子の標的である可能性が高く、老化制御機構における中心的なシグナル伝達系の直接のターゲットであることが強く示唆された。しかしながら HepG2 細胞においては、SMP30 遺伝子の定常状態における遺伝子発現に必須な何らかの因子が不足・欠損しているか、または、遺伝子発現を強く抑制している因子が存在していることが予想された。マウス由来の細胞においても同様の発現の低さが見られたため、これはヒト細胞に特有の現象ではなく、invitro における細胞培養条件が原因である可能性が考えられた。

## (3) ヒト SMP30 遺伝子の Fox0 転写因子による制御の可能性の検討

Fox0 転写因子によって制御を受ける遺伝子はすでに多数知られている。肝臓に焦点をしばると、Fox0 転写因子は糖新生 gluconeogenesis で極めて重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、Fox0 転写因子が何らかの要因により不必要に活性化されると、糖新生が異常に亢進し糖尿病に至ることが分かっている。これらの知見から、HepG2 細胞において Fox0 転写因子をできるだけ活性化できる条件を見つけることが重要であり、その条件下でクロマチン免疫沈降法を行う必要があると考えられた。

Fox0 転写因子はさまざまな修飾を受け活性が制御されることが分かっている。SIRT1 は長寿遺伝子として知られていたが、Fox0 転写因子の制御のひとつは SIRT1 による脱アセチル化である。Fox0 転写因子は SIRT1 の直接の基質であり脱アセチル化を受ける。そこで、HepG2 細胞において SIRT1 活性化剤であるレスベラトロールを作用させると、わずかではあるが SMP30 のタンパク質量が増加することが観察された。また、同時に、血清飢餓刺激によっても SMP30 タンパク質がわずかに増加することも観察された。また、線虫において寿命延長効果を持つことが報告されている因子で、SIRT1 と関連のある分子として AMP-activated protein kinase (AMPK) が知られているが、AMPK の活性化剤であるメトフォルミン刺激では SMP30 タンパク質の発現量に変化が見られなかった。このようにさまざまな薬剤刺激を試してみたが、依然としてヒ

トSMP30タンパク質の発現量を顕著に増加させることはできず、SMP30のFoxO転写因子による制御を直接証明することは困難であると考えられた。

FoxO転写因子を最大限に活性化する方策を試行しているなかで、先行研究から、FoxO転写因子の活性には転写コアクティベーターである Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1a)の存在が必要であり、FoxO転写因子による遺伝子発現制御はPGC-1aの発現量に強く依存することが報告されていた。この報告では、FoxO転写因子の標的であることが分かっているある遺伝子の発現を検討しているが、通常の培養条件においてもインスリンによるこの遺伝子の発現抑制は観察されていた。しかしながら、インスリン刺激を行っていないコントロールの細胞におけるこの遺伝子の発現量が極めて微量であることが指摘されていた。この細胞でPGC-1aを高発現させると、インスリン刺激をしていないコントロールの細胞においてこの遺伝子の発現が顕著に高まっていた。また、PGC-1aの高発現の条件においても、インスリンによる発現抑制効果は強く観察され、PGC-1aの高発現が非特異的にこの遺伝子を活性化しているのではないことが示されていた。

PGC-1aによるFoxO転写因子の遺伝子発現調節が、ここで報告された遺伝子に特異的な制御ではなく、FoxO転写因子の標的遺伝子に普遍的に見られる制御である可能性が考えられた。すなわち、上述のFoxO転写因子の標的遺伝子と同様の発現調節がSMP30遺伝子においても存在する可能性が考えられた。そこで、HepG2細胞においてPGC-1aのタンパク質量を増加させる薬剤として forskolin と dexamethasone を作用させたと、PGC-1aのタンパク質量の増加と同時にヒトSMP30のタンパク質発現量の増加が観察された。また、cAMPシグナルの活性化と糖質コルチコイドによるSMP30のタンパク質発現量の増加は、インスリン刺激により完全にキャンセルされた。したがって、cAMPおよび糖質コルチコイドにより誘導される定常状態でのSMP30の増加は、インスリン・インスリン様成長因子シグナルにより負に制御されており、インスリン・インスリン様成長因子シグナルがcAMPシグナルよりも優性であった。このことから、ヒトSMP30遺伝子はFoxO転写因子による転写制御を受けていることが強く示唆された。すなわち、定常状態におけるヒトSMP30のタンパク質発現量はPGC-1aのタンパク質発現量と相関を持って変化するようであるが、FoxO転写因子の活性をオフにする機構はPI3K-Aktパスウェイを介したFoxO転写因子自体のリン酸化によるものである可能性が高いと考えられた。

そこで、HepG2細胞においてPGC-1aの強制

発現を行ってヒトSMP30の発現制御がFoxO転写因子に依存することを証明する実験と、もうひとつは、PGC-1a自体の発現調節機構を解明する実験のふたつが考えられた。先行研究の量の多さから、後者の研究のほうがより実現性が高い研究であると考えられた。

#### (4) まとめと今後の展望

ここまでの結果から、ヒトHepG2細胞において、通常の培養条件下でSMP30タンパク質の発現量が著しく微量である原因としては、血清に含まれるgrowth factorによるPI3K-Aktの活性化によりSMP30遺伝子の発現が強く抑制されていることが考えられた。またこれと強く関連することであるが、HepG2細胞におけるPGC-1aの発現量がかつとも非常に低いことがSMP30タンパク質量の発現量が低いことの原因のひとつであると考えられた。細胞培養の条件において、成長因子を減らすことと、飢餓状態を模倣できるホルモンを添加することがSMP30とPGC-1aの発現量を増加させるための条件であると考えられた。

上述のように、ヒトSMP30遺伝子の発現制御はFoxO転写因子により制御を受けることが示唆されたが、PGC-1aが十分に発現していない細胞・条件下ではFoxO転写因子による転写制御を直接的に証明するのは極めて困難であると考えられた。そこで、SMP30遺伝子の発現制御を解明するためには、PGC-1aの発現制御機構を検討することが必須であり、これを明らかにすることがヒトSMP30の発現調節機構を解明する上で最も重要な課題であると考えられる。

研究代表者は現在までに、PGC-1aへ飢餓シグナルを伝達し発現を調節していると考えられる因子の遺伝子のクローニングが終了しており、今後、この遺伝子を強制発現またはsiRNAによる発現抑制を行い、PGC-1aおよびSMP30の発現量の変化を検討していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新井 秀明 (ARAI, Hideaki)  
東京大学・大学院総合文化研究科・助教  
研究者番号：60313160

(2) 連携研究者

丸山 直記 (Maruyama, Naoki)  
東京都健康長寿医療センター研究所・  
参事研究員 (副所長)  
研究者番号 : 00115940